

D1

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 149 899 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
31.10.2001 Bulletin 2001/44

(51) Int Cl.7: **C12N 5/06, C12N 5/10,
A01K 67/027**

(21) Numéro de dépôt: **01108584.2**

(22) Date de dépôt: **20.10.1995**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL
PT SE**

(30) Priorité: **21.10.1994 FR 9412598**

(62) Numéro(s) de document de la (des) demande(s)
initiale(s) en application de l'article 76 CBE:
95935994.4 / 0 787 180

(71) Demandeurs:
• **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE
75007 Paris (FR)**
• **CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
75794 Paris Cedex 16 (FR)**

• **ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
69007 Lyon Cédex 07 (FR)**

(72) Inventeurs:
• **Samarut, Jacques
69100 Villeurbanne (FR)**
• **Pain, Bertrand
69003 Lyon (FR)**

(74) Mandataire: **Warcoin, Jacques et al
Cabinet Régimbeau
20, rue de Chazelles
75847 Paris cedex 17 (FR)**

Remarques:

Cette demande a été déposée le 05 - 04 - 2001
comme demande divisionnaire de la demande
mentionnée sous le code INID 62.

(54) **Milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires**

(57) La présente invention se rapporte à l'obtention
de cellules ES d'oiseau, en particulier à un procédé de

culture et à un milieu permettant la culture de ces cellules.

BEST AVAILABLE COPY

EP 1 149 899 A1

Description

[0001] La présente invention se rapporte à l'obtention de cellules ES d'oiseau, en particulier à un procédé de culture et à un milieu permettant la culture de ces cellules.

[0002] En effet, dans le cadre de la mise au point de technique de production de protéines recombinantes, le développement d'une technique de transgénèse chez les oiseaux domestiques aura des retombées économiques extrêmement importantes dans deux applications majeures:

- 1. le développement de souches aviaires présentant des caractères génétiques déterminés (résistance à certaines maladies, performances de croissance, etc)
- 2. le développement de systèmes de production de protéines recombinantes dans l'albumen de l'oeuf.

[0003] L'industrie biotechnologique s'intéresse de plus en plus à la possibilité de produire des protéines d'intérêt dans des fluides biologiques ou des organismes (sang, lait, plantes, ...). La production de telles protéines dans l'oeuf d'oiseau domestique constituera certainement dans cette voie une avancée technologique majeure pour plusieurs raisons:

- de nombreuses protéines de mammifères ne peuvent être produites en système mammifère car leur surabondance dans ces organismes présente des effets délétères (exemple: l'érythropoïétine qui chez le lapin induit des hyperglobulinémies pathologiques). Beaucoup de ces protéines d'intérêt ne présentent pas d'activité croisée avec celles des oiseaux, autorisant ainsi leur surproduction dans un organisme aviaire sans effet pathologique majeur;
- il est très vraisemblable que la commercialisation de protéines recombinantes produites chez des mammifères se heurtera à des problèmes sanitaires liés à la présence chez cette espèce d'organismes latents potentiellement pathogènes pour l'Homme (lentivirus, prions,...). Ce risque est très minime, pour ne pas dire quasiment inexistant, pour des agents pathogènes des oiseaux domestiques;
- l'oeuf constitue un "tissu" très dense en un petit nombre de protéines. Par exemple la protéine majeure de l'oeuf d'oiseau, l'ovalbumine représente 54 % des protéines du blanc d'oeuf, soit un poids sec moyen par oeuf de 2 grammes de matière sèche environ. On peut raisonnablement imaginer produire par oeuf au moins 10% de cette masse en protéine recombinante. La rentabilité économique apparaît très grande si l'on considère qu'une poule pond en moyenne 2 oeufs tous les trois jours, et cette rentabilité apparaît très supérieure à celle de grands mammifères si l'on considère les coûts d'élevage bien moindres des oiseaux domestiques.

[0004] La réalisation d'oiseaux transgéniques est possible actuellement avec un coût extrêmement élevé à cause de sa très faible efficacité. En effet chez les oiseaux la technique de microinjection d'ADN dans l'oeuf est quasiment impossible. D'autre part l'utilisation du système des rétrovirus vecteurs, le seul système efficace à ce jour, reste complexe et se heurtera certainement à une réticence de la part des industriels pour des raisons sanitaires.

[0005] Une avancée très importante à la réalisation d'animaux transgéniques a été apportée chez la souris par le développement de la technologie des cellules ES.

[0006] Les cellules ES (pour Embryonic Stem cells) sont des cellules embryonnaires totipotentes capables de régénérer tous les tissus de l'embryon, y compris le tissu germinale, après leur injection dans des embryons très précoces. Ces cellules peuvent donc être considérées comme des chevaux de Troie pour introduire de nouvelles informations génétiques dans le patrimoine génétique d'un animal. La possibilité de cultiver ces cellules à long terme in vitro, offre la possibilité d'exercer de nombreux contrôles avant leur implantation in vivo. D'autre part ces cellules peuvent être conservées de façon illimitée dans l'azote liquide, ce qui constitue une possibilité de stockage d'un patrimoine génétique.

[0007] L'utilisation de cellules ES constitue aujourd'hui chez les oiseaux domestiques la voie la plus prometteuse pour la réalisation efficace d'animaux transgéniques. Des travaux récents d'un groupe canadien (R. Etches à la station de Guelph) ont suggéré que des cellules ES doivent exister dans l'embryon d'oiseau (Petitte et al., 1990). Ce groupe a réussi la transplantation de telles cellules dans des embryons, et par suite, la production d'animaux dont le patrimoine génétique est dérivé des cellules greffées. Cependant à ce jour la culture de ces cellules in vitro n'a pas pu être réussie ; par conséquent ces cellules n'ont pas pu être utilisées pour transférer de façon stable un transgène. C'est là un blocage majeur à l'exploitation de la technologie des cellules ES chez les oiseaux. Les cellules ES peuvent être caractérisées par trois types de critères essentiels :

- morphologie
- activité phosphatase alcaline endogène
- réaction avec des anticorps spécifiques d'un état de totipotence (ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3 notamment).

[0008] Aucune culture de cellules ES identifiées par l'ensemble de ces caractéristiques n'a pu être obtenue à ce jour.

[0009] C'est pourquoi la présente invention a pour objet un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant : les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogue

de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches,

et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinolique actif.

[0010] De manière avantageuse, l'acide rétinolique est substantiellement inactivé par des anticorps anti-acide rétinolique (ARMA) présents dans le milieu.

[0011] En effet, les milieux employés contiennent souvent du sérum, dont on ne peut contrôler la quantité endogène d'acide rétinolique. En testant l'effet de l'incorporation au milieu de culture d'un anticorps monoclonal anti-acide rétinolique qui neutraliserait l'action de ce dernier, sur la différenciation des cellules, la Demanderesse a constaté que la présence de cet anticorps accroît la présence dans les cultures de cellules et colonies à activité phosphatase alcaline.

[0012] La cytokine peut notamment être choisie parmi le LIF, IL-11, IL-6, CNTF et oncostatine M (OSM) ; de manière avantageuse les cytokines présentes dans le milieu de culture décrit précédemment, comprennent au moins une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6, et leurs différents mélanges, qui donnent les meilleurs résultats de stimulation de croissance.

[0013] De préférence, le facteur de croissance des fibroblastes est le b- FGF (ou basic Fibroblast Growth Factor) et le facteur de croissance analogue de l'insuline est l'IFG-1.

[0014] Le facteur de croissance des cellules souches (ou SCF) est de préférence l'a-SCF (ou avian Stem Cell Factor) et le m-SCF (ou murine Stem Cell Factor).

[0015] L'un des aspects préférés de l'invention concerne un milieu de culture qui contient, outre les éléments nutritifs de base nécessaires à la croissance de cellules, une combinaison de b-FGF, SCF et LIF. En outre, la présence dans le milieu d'un anticorps monoclonal neutralisant l'activité de différenciation exercée par l'acide rétinolique augmente le nombre de cellules souches embryogènes totipotentes.

[0016] La présence d'un tapis de cellules nourricières favorise la croissance de cellules ES aviaires. Divers types de cellules connues de l'homme du métier peuvent être utilisées ; on peut citer en particulier des cellules telles que les cellules STO, traitées à la mitomycine ou irradiées, les cellules BRL-3A, les cellules LMH, les cellules QT6 et cellules QT6 modifiées telles que les cellules QT6 Isolde, les cellules différenciées établies en lignée à partir des cultures de cellules souches embryonnaires induites à différencier.

[0017] Les cellules STO sont des fibroblastes d'embryons de souris (catalogue ATCC); les cellules BRL-3A (catalogue ATCC) sont des cellules de foie de "Buffalo rat liver". Les cellules QT6 (catalogue ATCC) et cellules QT6 modifiées telles que les cellules QT6 Isolde sont des fibroblastes de caille (Cosset et col., 1990, J. Virol. 64, 10170-1078) et les cellules LMH proviennent de carcinome de foie de poulet (Kawaguchi et col., 1987, Cancer Res., 47, 4460-4464).

[0018] Le milieu de culture contient en outre différents éléments nutritifs essentiels et des antibiotiques.

[0019] Un milieu de culture particulièrement adapté à la présente invention possède la composition suivante :

BHK-21	
Sérum foetal de bovin	10%
Sérum de poulet	2%
Conalbumine	20 ng/ml
Acides aminés non essentiels	1%
Pyruvate de sodium	1 mM
Nucléosides stock	1%
Hepes (1M)	10 mM
β -mercaptoéthanol	-0,2 mM
Penicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 μ g/ml
Gentamycine	10 ng/ml

Additifs:	
	Final
bFGF	de 1 à 20 ng/ml

EP 1 149 899 A1

(suite)

Additifs:	
	Final
a-SCF	de 0,5% à 2% vol SN de COS/vol
IGF-1	de 5 à 50 ng/ml
LIF	de 1000 à 5000 U/ml de forme purifiée soit environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées
IL-6	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)
IL-11	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)

[0020] De manière avantageuse la concentration en bFGF est supérieure à 5 ng/ml et la concentration en IGF-1 est supérieure à 10 ng/ml. avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

adénosine	80 mg
guanosine	85 mg
cytidine	73 mg
uridine	73 mg
thymidine	24 mg
H ₂ O	100 ml

et SN de Cos représentant un surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du cDNA du facteur considéré, et convient à la culture de cellules embryonnaires totipotentes d'oiseau.

[0021] Le milieu BHK21 (ou milieu MEM) est un milieu de culture qui a été décrit notamment par Me Pherson, I., et Stoker (1962, Virology 16, 147).

[0022] Hepes est de l'hydroxy-éthyl-pipérazine-éthane-sulfonate.

[0023] Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES aviaires), caractérisé en ce que :

- on met en suspension des cellules provenant de disques blastodermiques d'oeufs fécondés dans un milieu de culture pour cellules aviaires comprenant en outre au moins un composé choisi parmi les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches, et dans lequel l'acide rétinolique est substantiellement inactivé,
- onensemence un tapis de cellules nourricières ou une boîte de culture gélatinée avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),
- on met les cellules à incuber pendant une durée déterminée,
- les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des cellules ES d'oiseau.

[0024] De préférence, entre les étapes c) et d) on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape a).

[0025] Dans un de ses modes de mise en oeuvre, au cours de l'étape c), on effectue un réensemencement du milieu par une suspension de cellules identique à la suspension préparée à l'étape a).

[0026] Le milieu de l'étape a) contient de préférence les éléments suivants: b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et anticorps anti-acide rétinolique. Selon l'un des aspects de l'invention, il contient en outre les composés suivants :

- Sérum foetal de bovin
- Sérum de poulet
- Conalbumine
- Acides aminés non essentiels
- Pyruvate de sodium
- Stock de nucléosides
- Hepes (1M)
- β-mercaptoéthanol
- Penicilline

Streptomycine
Gentamycine

avec le stock de nucléosides, constitué du mélange :

adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

[0027] De manière facultative, au cours du procédé selon l'invention, on effectue entre les étapes c) et d) l'addition de milieu neuf au 3^{ème} jour puis le milieu est changé tous les jours jusqu'au prochain repiquage.

[0028] L'étape d) peut notamment être effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

[0029] On peut recueillir directement les cultures primaires de cellules, qui seront ensuite congelées, ou bien réaliser des cultures secondaires successives à partir des cellules de la culture primaire. Dans ce cas, à l'issue de l'étape d), on effectue une étape c) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières, ou sur boîtes gélatinées, de manière à obtenir une culture secondaire.

[0030] Les étapes d) et e) peuvent être répétées plusieurs fois pour avoir des cultures tertiaires et successives.

[0031] Le tapis de cellules nourricières peut être constitué de différents types de cellules décrits précédemment, notamment de cellules STO mitomycinéées ou irradiées.

[0032] Un autre des objets de l'invention est une culture de cellules ES d'oiseau, ou des cellules ES aviaires, susceptibles d'être obtenues par le procédé défini ci-dessus. Une cellule embryonnaire totipotente aviaire modifiée peut être obtenue par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue dans le génome d'une cellule ES-aviaire en culture.

[0033] Enfin, un procédé de production d'une protéine recombinante, caractérisé en ce qu'on intègre le gène codant pour ladite protéine dans le génome d'une cellule embryonnaire totipotente aviaire en culture est également compris dans l'invention.

[0034] La Demanderesse a mis au point un milieu de culture et des conditions de culture in vitro permettant de maintenir en culture des cellules d'oiseau qui présentent des propriétés morphologiques, cinétiques et histochimiques rappelant celles des cellules embryonnaires totipotentes. Ces observations ont été effectuées aussi bien avec des cellules dérivant de disques blastodermiques de caille que de poulet. La croissance de ces cellules en culture in vitro est rendue possible par la mise au point d'un milieu original spécialement adapté à la culture de cellules embryonnaires d'oiseau. On sait que la présence, le maintien et la propagation de cellules totipotentes en culture permettent leur injection dans des embryons receveurs. La contribution à la morphogenèse des tissus somatiques et germinaux chez les animaux receveurs grâce à un caractère totipotent, peut conduire à l'obtention d'animaux transgéniques.

[0035] Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1: Effet des combinaisons de facteurs

- blastoderms de caille, 0,75 bl/ml
- fond de gélatine
- culture de 3 j

Figure 2: effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

- blastoderms de caille, 0,75 bl/ml
- fond avec ou sans gélatine
- culture de 4 j

Figure 3: comparaison de différentes cytokines

- blastoderms de caille, 2 bl/ml
- fond avec gélatine
- culture de 2 + 3 j

Figure 4: Comparaison d'un ensemencement sur gélatine et sur tapis de cellules traitées à la mitomycine C en présence de différentes cytokines appartenant toutes à la même famille.

4A:

- blastoderms de caille, 1 + 1,5 bl/ml

EP 1 149 899 A1

- fond avec gélatine
- culture de 3 + 4 j

4B:

- blastoderms de caille, 1 + 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 3 + 4j

Figure 5: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par ECMA-7

- blastoderms de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

Figure 6: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par NC-1

- blastoderms de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

Figure 7: Animaux chimères obtenus par injection in ovo dans des embryons de cellules maintenues en culture. Cellules injectées après 8 ou 10 jours de culture.

Matériel et méthodes

Préparation des cellules

[0036] Les oeufs de poules fraîchement pondus, non incubés, correspondent au stade X de développement (Eyal Giladi and Kovak, 1976) ; les oeufs de caille "C. coturnix japonica" sont également utilisés dès la ponte et non incubés.

[0037] Le disque blastodermique (3-4 mm de diamètre pour la poule, 2-2,5 mm pour la caille) est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur dans du milieu complet sans facteurs. Les cellules sont centrifugées à 200 g, lavées deux fois dans du milieu afin d'éliminer le maximum de vitellus contaminant, resuspendues à raison de 2 disques pour 1 ml de milieu et dissociées mécaniquement par passage dans une aiguille de 23 G. Les facteurs sont alors ajoutés.

[0038] La suspension cellulaire est déposée:

- soit sur boîtes ou puits (Costar) préalablement gélatinés (0.2 % gélatine, 1 h à t° ambiante),
- soit sur un tapis de cellules STO préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm²,
- soit sur un tapis de cellules Isode préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm².

Milieu de culture STO :	
	final
DMEM	
Sérum foetal Bovin	10 %
Penicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
L-Glutamine	2 mM

Milieu de culture Isode :	
	final
DMEM	

(suite)

Milieu de culture Isolde :	
	final
Sérum foetal Bovin	8 %
Sérum de poulet	2 %
Penicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
G418	100 µg/ml
Hygromycine	50 µg/ml
Phléomycine	50 µg/ml
TBP (bouillon tryptose phosphate)	10%

[0039] Les drogues de sélection sont ajoutées en entretien mais enlevées deux jours avant le traitement à la mitomycine C.

[0040] Dans tous les cas, un second ensemencement est réalisé dans les mêmes conditions après deux jours de culture.

Cultures

[0041] Les cultures sont incubées à 37 °C ou à 41° C, dans une atmosphère contrôlée en CO₂ (7,5 %) et leur évolution est suivie au microscope en contraste de phase. Une addition partielle (50 %) de milieu neuf avec les facteurs est réalisée le 3^{ème} jour de culture, puis le milieu est changé tous les jours. A chaque moment, les cellules en croissance peuvent être soit fixées pour étude, soit prélevées pour être ré-ensemencées en culture secondaire ou supérieure, sur tapis de cellules STO mitomycinées irradiées ou sur boîtes gélatinées.

[0042] En cas de fixation, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis fixées in situ 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4 % à froid (0-4 °C). Après plusieurs lavages au PBS, différentes colorations peuvent être réalisées selon l'un des protocoles suivants :

* détection de l'activité phosphatase alcaline endogène,

tampon de réaction	NaCl	100 mM
	Tris HCl pH 9.5	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	NBT	1 mg/ml
	BCIP	0,1 m/ml
	H ₂ O	

(temps de lecture, de 5 à 30 min, 37°C)

** détection de l'activité de β-galactosidase exogène

tampon de réaction	Ferricyanure de K	5 mM
	Ferrocyanure de K	5 mM
	MgCl ₂	5 mM
	X-gal	1 mg/ml
	PBS	

(temps de lecture, de 1 à 2 heures, 37°C)

*** détection par immunocytochimie de la présence d'épitopes spécifiques (réaction à 4°C)

blocage en tampon PBS - BSA (1 mg/ml)

lavage en PBS - BSA

anticorps primaire 1/ 10^{ème} ou 1/ 50^{ème}

anticorps secondaire fluorescent 1/ 50^{ème}

EP 1 149 899 A1

la détection est réalisée sous microscope inversé à fluorescence.

Repiquage

[0043] En cas de passage en culture secondaire ou successive, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis incubées 10-30 min dans une solution enzymatique. On peut utiliser une solution de collagénase-dispase (1 mg/ml soit 1 U/ml final) à laquelle une solution de hyaluronidase (1 mg/ml final soit 1 U/ml) peut être ajoutée ; on peut également utiliser une solution de pronase à 0,25 mg/ml final. Les cellules ou les petits amas de cellules ainsi isolés enzymatiquement sont lavées en milieu ESA, resuspendus, déposés sur un coussin de milieu de séparation de lymphocyte de densité ($d = 1,077-1,080$) et centrifugés 20 min à t° ambiante à 800 g afin de débarasser les cellules non différenciées de blastoderms des cellules du tapis, des débris divers et des restes de vitellus contaminants. L'interface est alors prélevée, lavée deux fois en milieu ESA. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu et dissocié légèrement mécaniquement avant d'être ensemencé sur un nouveau tapis de cellules nourricières, comme précédemment décrit. L'équivalent de 6 disques blastodermiques initiaux est ré-ensemencé dans 2 ml. Cette étape de gradient n'est parfois pas nécessaire lors des passages successifs, en fonction de la très grande homogénéité des cultures obtenues.

[0044] Les cellules dissociées peuvent être déposées sur un gradient multicouche de Percoll et centrifugées dans les mêmes conditions. Les interfaces sont alors prélevées, lavées dans un milieu ESA et les cellules les plus immatures des interfaces supérieures réensemencées, ou injectées dans des embryons receveurs.

Congélation

[0045] A l'issue de la culture primaire ou successive, les cellules récupérées de gradient peuvent être congelées dans un mélange constitué de 40 % FBS, 50 % milieu ESA et 10 % DMSO. Les cellules équivalant à 24 blastodisques initiaux sont reprises dans 0,5 ml de milieu ESA, resuspendues et 0,4 ml de sérum est ajouté. 0,1 ml de DMSO est alors ajouté très lentement. La suspension de congélation est répartie dans des tubes à congélation (0,5 ml/tube) et congelée lentement à -80°C avant d'être transférée dans l'azote liquide.

Resultats

[0046] Un milieu de base appelé milieu "ESA" pour "Embryonic Stem cells Avian" dérivant d'un milieu utilisé pour les cellules ES murines a été préparé. Il présente la composition suivante :

Milieu "ESA":	
	final
BHK-21	
Foetal Bovine Serum	10%
Serum de poulet	2 %
Conalbumine	20 ng/ml
Acide Aminés non essentiels	1 %
Pyruvate de sodium	1 mM
Stock de nucléosides	1 %
Hepes (1M)	10 mM
β -mercaptoethanol	0.2 mM
Penicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 $\mu\text{g/ml}$
Gentamycine	10 ng/ml

[0047] A ce milieu de base "ESA", des facteurs de croissance ont été ajoutés afin de comparer leur contribution respective à la formation de colonies présentant un caractère morphologique et biochimique intéressant. Leurs concentrations sont indiquées ci-après :

Additifs:		
	stock	final
bFGF	10 $\mu\text{g/ml}$	10 ng/ml

(suite)

Additifs:		
	stock	final
5.	a-SCF	SN de Cos trans *
	IGF-1	10 µg/ml
	LIF	SN de Cos trans *
10	1L-11	10 µg/ml
	IL-6	10 µg/ml
	ARMA	10 mg/ml
15	OSM	20 µg/ml
	CNTF	20 µg/ml
stock de nucléosides		
20	adénosine	80 mg
	guanosine	85 mg
	cytidine	73 mg
	uridine	73 mg
25	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

* surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du cDNA du facteur considéré.

[0048] Le premier critère utilisé pour évaluer l'effet de ces facteurs et des modifications apportées au milieu a été la détection par coloration biochimique de l'activité phosphatase alcaline endogène qui semble spécifique d'un certain nombre de cellules telles que les cellules ES totipotentes, les cellules précurseurs dérivées de la lignée germinale et certaines cellules différenciées, facilement identifiables à leur morphologie épithélioïde.

[0049] Les cellules des disques blastodermiques sont ensemencées en milieu ESA en présence de différentes combinaisons de facteurs. Après 3 j de culture, les cellules sont fixées, colorées et les colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP+) sont dénombrées.

[0050] L'effet des différentes combinaisons de facteurs est représenté sur la figure 1.

Conclusion

[0051] Parmi les facteurs testés, la combinaison du SCF (Stem Cell Factor d'origine murine -mSCF- ou aviaire -aSCF-), du b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) et du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) donne le meilleur nombre de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline dans les cultures avec un accroissement de 2-3 fois par rapport à la présence de chaque facteur ajouté individuellement ou deux par deux et par rapport au fond, constitué en majorité de cellules faiblement positives et présentant une morphologie épithélioïde différenciée.

II) Effet de l'anticorps anti-acide rétinolique (ARMA)

[0052] Les cellules sont ensemencées soit sur boîtes non traitées, soit traitées à la gélatine dans du milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et LIF (Leukemia Inhibitory Factor). L'anticorps ARMA est ajouté à raison de 1 µg/ml final. Les cellules et colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP +) sont dénombrées après 4 j de culture.

[0053] Les résultats sont représentés sur la figure 2.

[0054] Comparativement aux différents moyens décrits comme l'utilisation de résine ou de charbon, et testés pour essayer de contrôler le niveau d'acide rétinolique dans le milieu, l'addition de l'anticorps anti acide rétinolique dans le milieu donne les meilleurs résultats quant à la qualité et la quantité des colonies présentes dans les cultures

Conclusion

[0055] L'addition de l'anticorps anti-acide rétinoïque dans le milieu de culture accroît de façon notable la présence et /ou le maintien des colonies à activité phosphatase alcaline.

III) Effet des cytokines

[0056] Nous avons voulu vérifier si le LIF ou d'autres cytokines de la même famille pouvait induire la prolifération des cellules ES chez l'oiseau.

[0057] Les cellules sontensemencées en milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) en présence d'ARMA (1 µg/ml) et après addition ou non de différentes cytokines de la même famille LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6). Afin d'accroître l'adhésion et la formation de colonies phosphatase alcaline positives ainsi que leur taille, un second ensemencement a lieu 2 jours après le premier. La fixation, coloration et lecture des colonies a eu lieu 3 jours après le second ensemencement.

[0058] La comparaison de l'effet des différentes cytokines est représentée sur la figure 3.

Conclusion

[0059] Le rôle des cytokines LIF, IL-11 et IL-6 semble particulièrement prononcé et pratiquement équivalent dans l'obtention de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline.

IV) Role d'un tapis de cellules nourricières

[0060] Chez la souris, la croissance de certaines cellules ES requiert la présence d'un tapis de cellules nourricières. L'effet de ces cellules sur les cellules d'embryons d'oiseau a été testé

[0061] Les cellules sontensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) comparativement soit sur un fond de gélatine soit sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après trois jours de culture, un nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines CNTF (Ciliary Neuro-Trophic Factor), OSM (Oncostatin M), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment.

[0062] La figure 4A représente la croissance de cellules sur gélatine en présence de différentes cytokines. La figure 4B représente la croissance de cellules sur un tapis de cellules nourricières en présence des mêmes cytokines.

Conclusion

[0063] Le nombre de colonies dérivant des cellules de blastoderme et présentant une activité phosphatase alcaline est très nettement accru en présence d'un tapis de cellules nourricières (environ 4-5 fois) avec un maintien entre les deux systèmes des même sensibilités vis à vis des cytokines ajoutées dans le milieu. Les cytokines LIF, IL-11 et IL-6 présentent les meilleurs résultats de stimulation de croissance. Dans des résultats préliminaires, il apparait de plus que la combinaison de ces 3 cytokines dans le milieu complet ESA avec facteurs produisent des effets cumulatifs très prometteurs quant au maintien et à la prolifération des colonies tant avec des cellules dérivées de disques blastodermiques de caille que de poulet.

V) Caractéristiques immunocytochimiques

[0064] Des études de réactivité par rapport à différents anticorps ont été réalisées. Les anticorps ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3, spécifiques d'un état de totipotence des cellules ES murines sont capables de reconnaître des épitopes dans les populations de cellules aviaires, maintenues dans les cultures. Pour illustrer ces reconnaissances par les anticorps, des doubles marquages activité phosphatase alcaline et anticorps démontrent que toutes les cellules ou les massifs de cellules reconnues par ECMA-7 présentent une activité phosphatase alcaline. Cette propriété a été observée avec tous les anticorps utilisés à des degrés divers.

[0065] Les colonies de cellules phosphatase alcaline positives sont pour environ 20 % d'entre elles marquées par l'anticorps ECMA-7. Cette reconnaissance suggère la présence dans ces massifs et dans ces seules conditions de culture de cellules à caractère "ES". Néanmoins, une hétérogénéité dans les massifs phosphatase alcaline positifs suppose des degrés variables dans l'intensité du caractère "ES".

[0066] Cette hétérogénéité de distribution a été observée sur des cultures primaires. Après repiquages, la proportion

de cellules positives, notamment pour ECMA-7, mais également pour SSEA-1 et EMA-1, tend à s'accroître de façon très importante pour obtenir des cultures très homogènes.

[0067] La figure 5 montre respectivement l'activité phosphatase alcaline et la reconnaissance par l'anticorps ECMA-7 de colonies de cellules issues de la culture de blastodermes de caille en présence de différentes cytokines.

[0068] Les anticorps SSEA-1, SSEA-3, également utilisés sur des cellules ES murines reconnaissent également des cellules aviaires dans les massifs phosphatase alcaline positifs.

[0069] Les anticorps NC-1, HNK-1 dirigés respectivement des épitopes de cellules de crêtes neurales et de cellules "human natural killer" reconnaissent en fait les mêmes épitopes et ont été montrés comme reconnaissant certaines cellules immatures du disque blastodermique de poulet. Dans notre système, ces deux anticorps reconnaissent là encore des cellules dans des massifs à activité phosphatase alcaline.

[0070] Les résultats avec NC-1 sont représentés sur la figure 6.

[0071] Les cellules sontensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après deux jours de culture, un nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment. La double coloration, activité phosphatase alcaline et détection des épitopes par anticorps est réalisée suivant les protocoles présentés précédemment.

[0072] Par ailleurs, l'anticorps EMA-1 (Hahnel and Eddy, 1986) initialement dirigé contre des épitopes présents sur les cellules primordiales de la lignée germinale murine a été utilisé contre ces mêmes cellules chez le poulet. En testant cet anticorps dans notre système de culture, nous pouvons démontrer que EMA-1 reconnaît des cellules et colonies de cellules présentant toutes une activité phosphatase alcaline. Il a été par ailleurs vérifié que cet anticorps EMA-1 ne reconnaissait les cellules ES murines que dans leur état de totipotence non différenciée.

[0073] Les anticorps ont été testés soit sur des cultures non différenciées obtenues telles que décrites dans Matériel et Méthodes soit sur des cultures qui ont été traitées avec un excès d'acide rétinolique ajouté à la culture (10^{-6} M) pendant au moins 48 heures. Le tableau ci-après indique l'état de reconnaissance par les différents anticorps utilisés.

Anticorps monoclonal	Non différenciées	Différenciées
ECMA-7	+++++	-
SSEA-1	+++++	-
SSEA-3	+++	-
TEC-01	+++++	-
TEC-02	+	+++
TEC-03	++	++
EMA-1	++++	+
EMA-6	+++	+
TROMA-1	-	++++
NC-1	++++	+
HNK-1	++++	+
NC-1 et HNK-1 reconnaissent les mêmes épitopes (Tucker et al, 1984)		
SSEA-1 et TEC 01 reconnaissent les mêmes épitopes		

[0074] Il apparaît que l'expression de ECMA-7 (Kemler et al. (1981)) est la plus importante, suggérant une véritable nature de cellules ES, que TEC-01 (Draber et al. (1987b)) et SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)) reconnaissent les mêmes épitopes sur des cellules non différenciées exclusivement. A l'inverse, l'augmentation d'expression de TEC-02 (Draber et al. (1987a)) peut dans ce sens indiquer un état de différenciation induit ou spontané. L'achèvement de cette perte de nature ES est caractérisée par la forte expression de TROMA-1 (Brulet et al. (1980)), présent sur les seules cellules différenciées. L'ensemble de ces anticorps permet donc d'avoir une idée sur l'état de différenciation d'une culture. Des anticorps comme TEC-03 (Draber et al. (1987a)) apparaissent comme relativement indifférents à

l'état prononcé de différenciation.

[0075] Il est par ailleurs à souligner que jusqu'à présent ni ECMA-7, ni SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03, TROMA-1 n'ont fait l'objet de publication démontrant la réactivité sur des coupes, des cellules ou tout matériel d'origine aviaire.

Conclusion

[0076] Parmi les anticorps testés, certains comme ECMA-7 (Kemler et al. (1981)), SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky et al. (1982)) sont caractéristiques des cellules "ES" murines. Ces anticorps reconnaissent des cellules donc potentiellement totipotentes dans les cultures aviaires. Les mêmes observations ayant été obtenues soit avec des cultures de caille soit de poule. D'autres anticorps comme EMA-1 (Hahnel and Eddy (1986)), NC-1 et HNK-1 (Obo and Balch (1981)) sont connus pour reconnaître des épitopes aviaires (et murin pour EMA-1, Urven et al. (1988)) de cellules très indifférenciées et donc aussi susceptibles de reconnaître un profil de cellules souches aviaires.

VI) Repiquage des cellules

[0077] Les cellules de disques blastodermiques de caille ou de poulet sontensemencées sur tapis de cellules nourricières STO. Après différents jours de culture, les cellules sont repiquées sur tapis de cellules STO comme décrit en Matériel et méthodes. La détection de cellules et massifs positifs à la fois pour l'activité de phosphatase alcaline et pour la colocalisation d'un marquage par ECMA-7 ou NC-1 suggère que les conditions de cultures sont définies pour maintenir dans les cultures secondaires et tertiaires des cellules à caractère totipotent. Le processus de repiquage assure d'ailleurs dès après le premier passage une homogénéité à l'ensemble de la culture, tant morphologiquement, que par la détection des différents épitopes. Les massifs de cellules deviennent très étendus et homogènes, caractère accru par la grande capacité de ces cellules à se diviser rapidement, contrairement aux cellules différenciées présentes initialement dans la culture primaire. Jusqu'à présent, ces critères d'identification et de caractérisation peuvent être utilisés et détectés pendant au moins 5 semaines après l'ensemencement.

VII) Injection des cellules dans des embryons receveurs

[0078] Les cellules blastodermiques de poulet obtenues en cultures primaires ou après repiquages successifs peuvent être injectées dans des embryons receveurs. Afin de visualiser rapidement une contribution phénotypique des cellules du donneur dans un embryon de poussin receveur, les cellules maintenues en culture proviennent d'une souche pigmentée et les embryons receveurs d'une souche non pigmentée. Les cellules maintenues en cultures sont dissociées et préparées comme décrit dans Matériel et Méthodes selon le même procédé que pour un repiquage. La suspension cellulaire est alors préparée à raison de 1 à 3 x 10⁵ cellules par ml de milieu ESA. L'oeuf fraîchement pondu, non incubé contenant l'embryon receveur est légèrement irradié entre 5 Gy et 7 Gy. Une petite fenêtre de quelques mm² est réalisée dans la coquille du receveur par meulage. La membrane coquillière est découpée au scalpel et les cellules sont injectées à l'aide d'un capillaire étiré dans la cavité subgerminale du disque blastodermique dans un volume de 1 à 5 µl, ce qui correspond de 100 à 1500 cellules au maximum. La moyenne des cellules injectées est de 500 cellules. La fenêtre est alors recouverte de membranes coquillières et scellée. Un morceau de pansement adhésif est appliqué pour parfaire l'étanchéité et limiter au maximum l'évaporation. Après 4 jours d'incubation dans les conditions optimales, les oeufs sont ouverts et les embryons bien développés sont transférés dans une coquille plus grande et remis en incubation pour finir leur développement de façon satisfaisante.

[0079] Un certain nombre d'animaux ont ainsi été obtenus et montrent un taux apparent de chimérisme, phénotypiquement détectable par le marqueur de plumage utilisé et caractéristique de la souche des cellules dérivant de la souche donneur, variant de 5% à 90%. Ce chimérisme peut être obtenu jusqu'à présent indifféremment avec des cellules dérivant de cultures primaires, secondaires, tertiaires. Il est à noter que les pourcentages d'animaux chimères et les taux de chimérisme de ces animaux ne varient pas de façon importante en fonction du temps de culture des cellules injectées. Ceci contribue à souligner la capacité du milieu et du procédé décrit à maintenir des cellules avec un caractère totipotent.

Exemple : animal controle non injecté (Fig. 7A)

[0080]

Animal n° 1786-1787 à faible taux de chimérisme (5-10%)

Animal n° 1782-1783 à taux moyen de chimérisme (50%)

Animal n° 1740-1741 à fort taux de chimérisme (90%)

[0081] Ces animaux sont présentés sur les figures 7B à 7D.

5 REFERENCES

[0082]

- 10 Bralet et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4113.
- Draber et al. (1987a), Cell Differentiation 21, 119.
- Draber et al. (1987b). Cell differentiation 21, 227.
- 15 Eyal Giladi and Kovak (1976), Developmental Biology, 49, 321-337
- Hahnel and Eddy (1986). Gamete Research 15, 25.
- 20 Kemler et al. (1981). J. Embryo. Exp. Morph. 64, 45.
- Obo and Balch (1981). J. Immunology 127, 1024,
- Petitte et al (1990) Development 108, 185-189
- 25 Solter and Knowles (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5565.
- Shevinsky et al. (1982). Cell 30, 697.
- 30 Tucker et al. (1984). Cell Differentiation 14, 223.
- Urven et al. (1988). Development 103, 299.

Revendications

- 35 1. Milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, **caractérisé en ce qu'il** comprend au moins une cytokine, b-FGF, et SCF.
- 40 2. Milieu de culture selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'il** comprend des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA).
3. Milieu de culture selon la revendication 1 ou 2, **caractérisé en ce que** la cytokine est choisie parmi le LIF (leukemia inhibitory facteur), IL-11 (interleukine-11), IL-6 (interleukine-6), CNTF (ciliary neurotrophic factor), oncostatine M (OSM) et leurs mélanges.
- 45 4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, **caractérisé en ce qu'il** contient au moins une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6 et leurs différents mélanges.
- 50 5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce qu'il** contient un facteur de croissance analogue de l'insuline qui est l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1).
6. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 6, **caractérisé en ce que** le facteur de croissance des cellules souches SCF est choisi parmi l'a-SCF (avian stem cell factor) et le m-SCF (murine stem cell factor).
- 55 7. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 6, **caractérisé en ce qu'il** comporte un tapis de cellules nourricières.
8. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 7, **caractérisé en ce qu'il** contient en outre les composés

suivants :

- Sérum foetal bovin,
- Sérum de poulet,
- Conalbumine,
- Acides aminés non essentiels,
- Pyruvate sodium,
- Stock de nucléosides,
- Hepes (1M)
- β -mercaptoéthanol,
- Penicilline,
- Streptomycine,
- Gentamycine

avec le stock de nucléosides constitués du mélange : adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

9. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 8, **caractérisé en ce qu'il** est essentiellement dépourvu d'acide rétinolique actif.

10. Procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES aviaires), **caractérisé en ce que** :

- a) On met en suspension des cellules provenant de disques blastodermiques d'oeufs fécondés dans un milieu de culture pour cellules aviaires selon l'une des revendications 1 à 9,
- b) On ensemence un tapis de cellules nourricières avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),
- c) On met les cellules à incuber,
- d) Les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des cellules ES d'oiseau.

11. Procédé selon la revendication 10, **caractérisé en ce qu'entre** les étapes c) et d), on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape a).

12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, **caractérisé en ce que** le milieu de l'étape a) contient les éléments suivants : b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et des anticorps anti-acide rétinolique.

13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, **caractérisé en ce que** le milieu de l'étape a) contient en outre les composés suivants :

- Sérum foetal bovin,
- Sérum de poulet,
- Conalbumine,
- Acides aminés non essentiels,
- Pyruvate sodium,
- Stock de nucléosides,
- Hepes (1M)
- β -mercaptoéthanol,
- Penicilline,
- Streptomycine,
- Gentamycine

avec le stock de nucléosides constitués du mélange : adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, **caractérisé en ce qu'entre** les étapes c) et d), on effectue l'addition de milieu neuf au 3^{ème} jour, puis tous les jours.

15. Procédé selon l'une des revendications 10 à 14, **caractérisé en ce que** l'étape d) est effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

16. Procédé selon l'une des revendications 10 à 15, **caractérisé en ce qu'à l'issue de l'étape d), on effectue une étape e) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières, en présence de milieu selon la revendication 1, de manière à obtenir une culture secondaire.**

5 17. Procédé selon la revendication 16, **caractérisé en ce que les étapes d) et e) sont répétées plusieurs fois.**

18. Procédé selon l'une des revendications 10 à 17, **caractérisé en ce que le tapis de cellules nourricières est constitué de cellules STO mitomycinéées ou irradiées.**

10 19. Culture de cellules ES aviaires *in vitro* susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 10 à 18, ladite culture comprenant un milieu de culture selon la revendication 1.

15 20. Culture de cellules ES aviaires selon la revendication 19, **caractérisée en ce qu'elle présente 2 à 3 fois plus de colonies positives pour l'activité alcaline phosphatase par rapport au fond constitué en majorité de cellules faiblement positives.**

21. Culture de cellules ES aviaires selon la revendication 19, **caractérisée en ce que les cellules réagissent spécifiquement avec au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6.**

20 22. Culture de cellules ES aviaires selon la revendication 21, **caractérisée en ce que les cellules ne réagissent pas avec l'anticorps TROMA-1.**

25 23. Culture de cellules ES aviaires selon l'une des revendications 20 à 22, **caractérisée en ce que les cellules sont modifiées par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue.**

24. Cellule ES aviaire isolée **caractérisée en ce qu'elle est alcaline phosphatase positive.**

30 25. Cellule ES aviaire selon la revendication 24 **caractérisée en ce qu'elle réagit spécifiquement avec au moins un anticorps sélectionné parmi ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 et EMA-6.**

26. Cellule ES aviaire selon la revendication 25 **caractérisée en ce qu'elle ne réagit pas avec l'anticorps TROMA-1.**

27. Cellule ES aviaire selon l'une des revendications 24 à 26, **caractérisée en ce qu'elle est modifiée.**

35 28. Cellule ES aviaire selon la revendication 27, **caractérisée en ce qu'elle est modifiée par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue.**

40 29. Cellule ES aviaire selon l'une des revendications 24 à 28, **caractérisée en ce qu'elle contribue à la morphogenèse des tissus somatiques chez les animaux receveurs.**

30. Cellule ES aviaire selon l'une des revendications 24 à 28, **caractérisée en ce qu'elle contribue à la morphogenèse des tissus germinaux chez les animaux receveurs.**

45 31. Animal transgénique appartenant à l'espèce aviaire comprenant au moins une cellule selon la revendication 28.

50

55

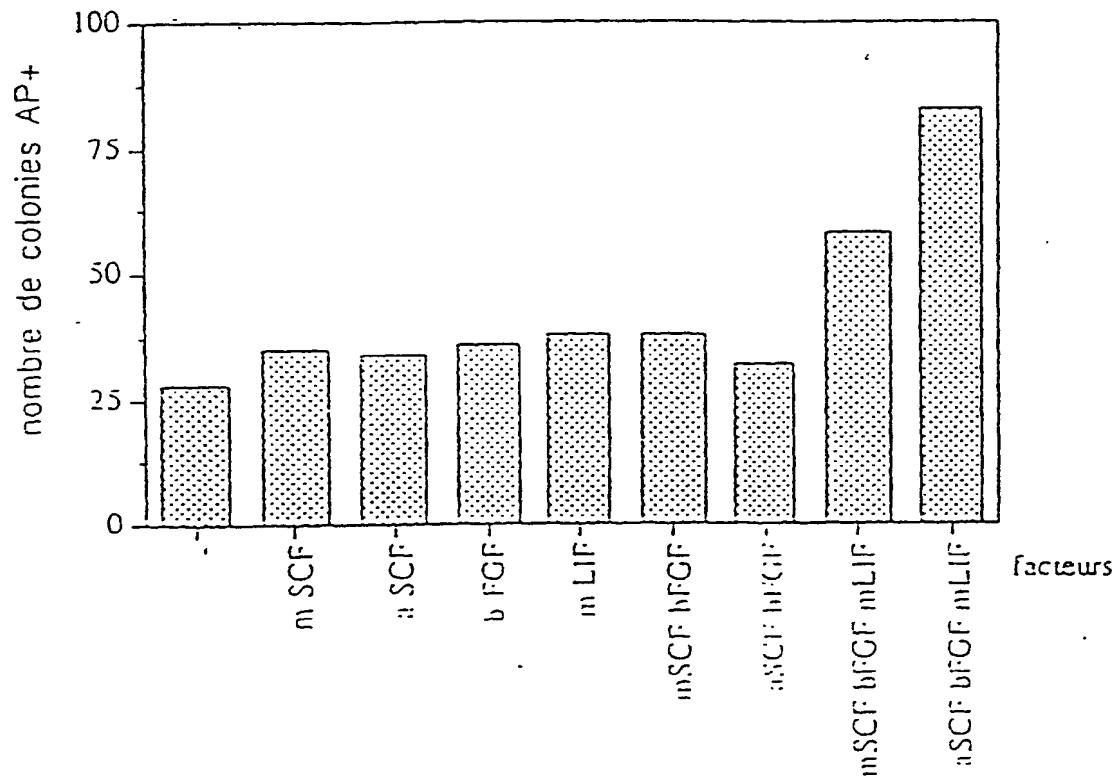


Figure 1

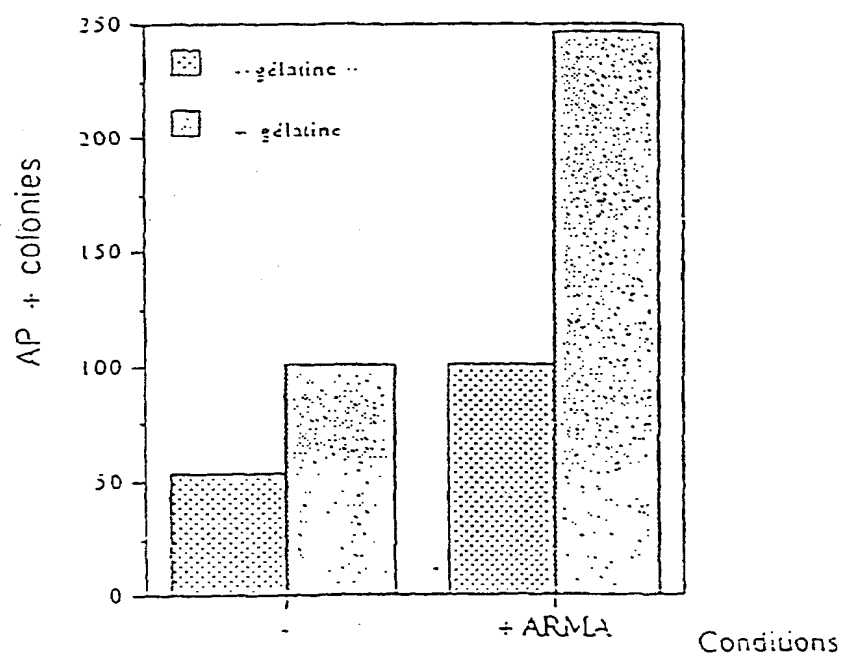


Figure 2

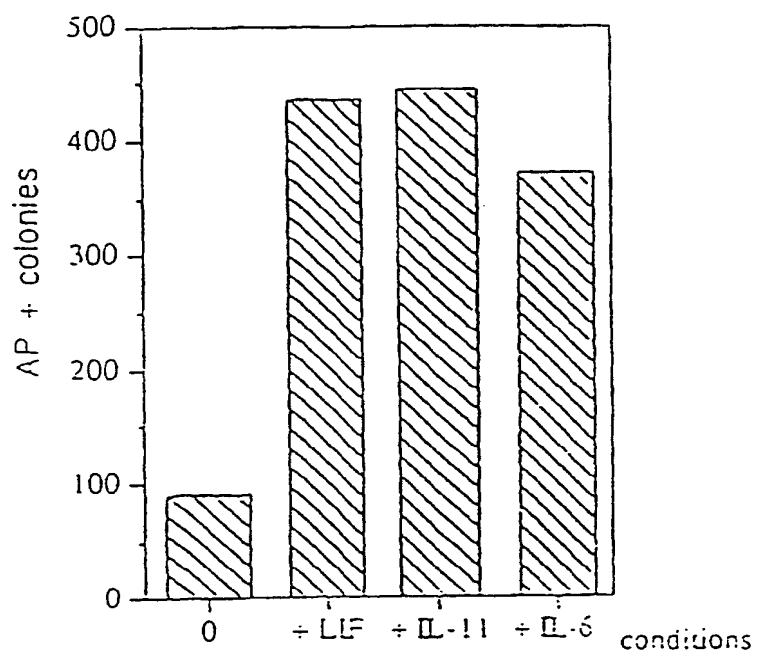
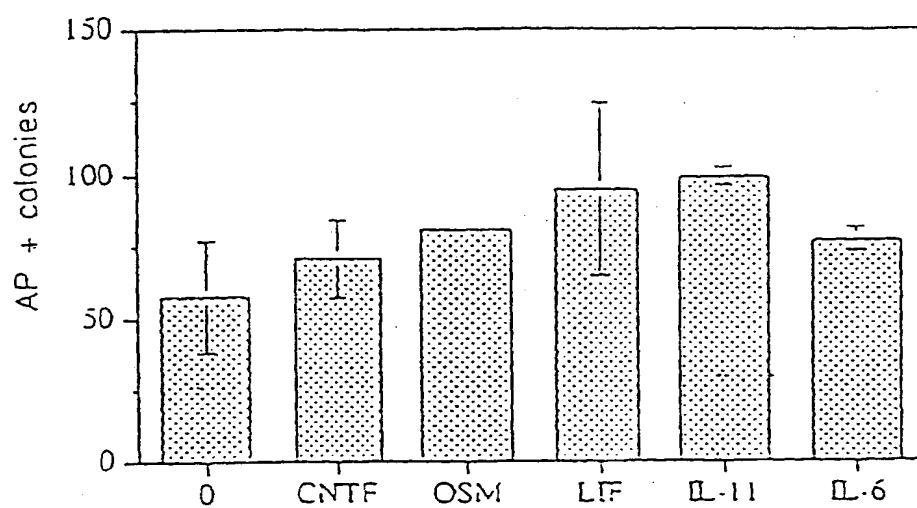
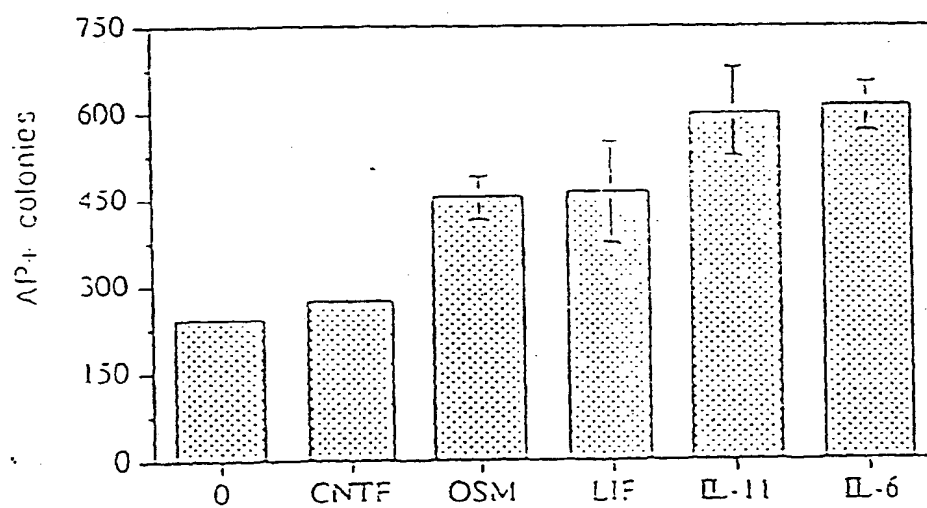


Figure 3



A



B

Figure 4

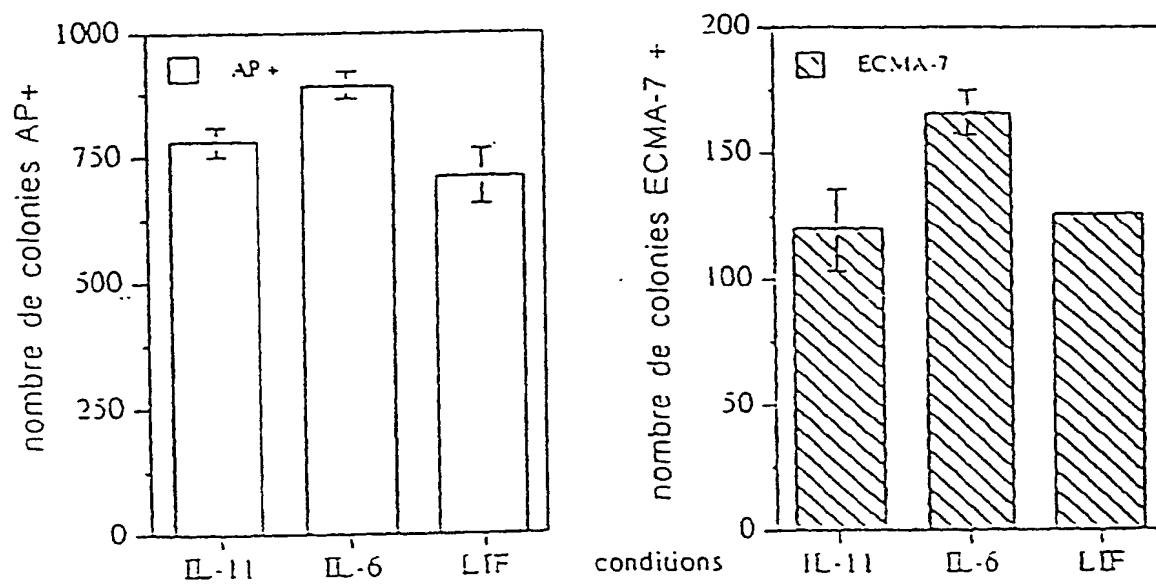


Figure 5

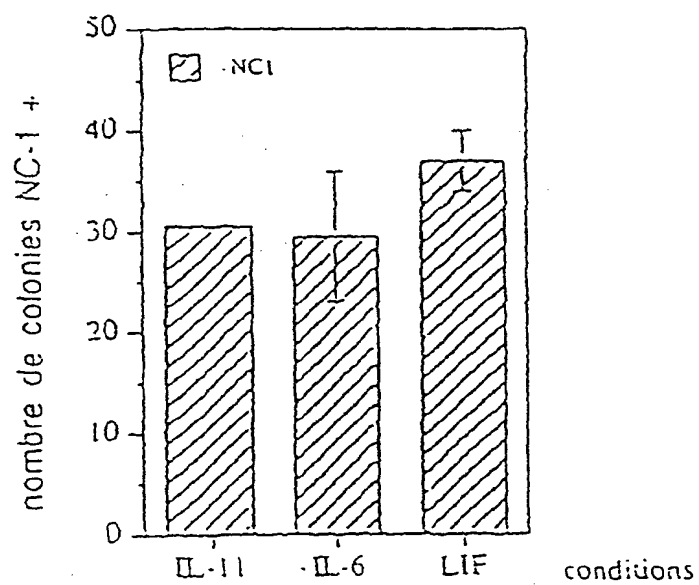


Figure 6

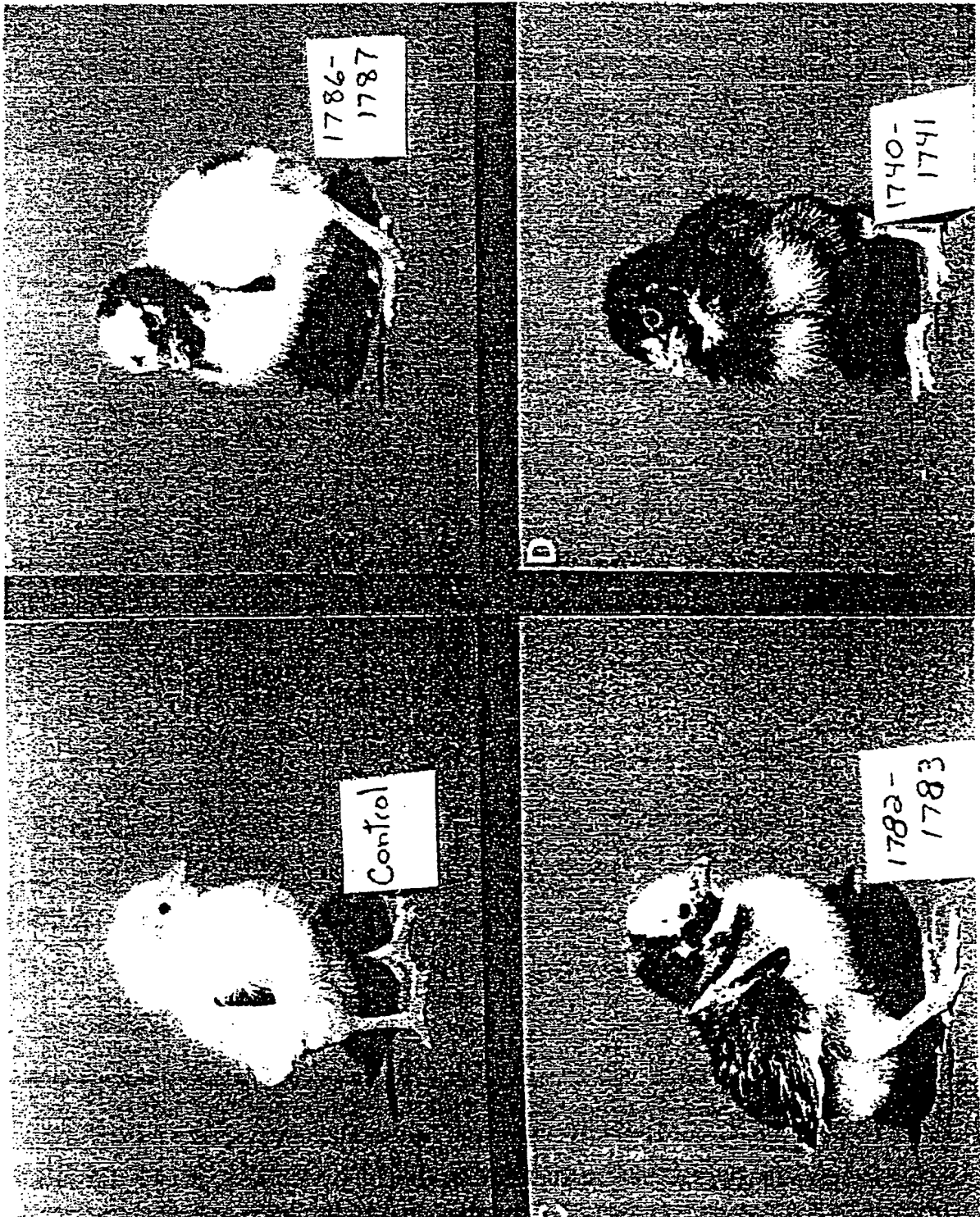


Figure 7



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 01 10 8584

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
X	WO 93 15185 A (UNIV NORTH CAROLINA ; EMBREX INC (US)) 5 août 1993 (1993-08-05) * page 3, ligne 35 - page 4, ligne 37 *	19-31	C12N5/06 C12N5/10 A01K67/027
X	WO 93 23528 A (UNIV NORTH CAROLINA ; PETITTE JAMES N (US); YANG ZENG MING (US)) 25 novembre 1993 (1993-11-25) * page 1, ligne 6 - page 4, ligne 18 * * page 4, ligne 32 - page 6, ligne 27 *	19-31	
A			
X	WO 90 01541 A (AMRAD CORP LTD) 22 février 1990 (1990-02-22) * page 1, ligne 16 - page 5, ligne 27 *	19-31	
X	WO 94 03585 A (DYER SHANNY LEIGH ; JENNINGS PHILIP (AU); LOCKETT TREVOR (AU); COMM) 17 février 1994 (1994-02-17) * page 2, ligne 14 - page 6, ligne 3 *	19-31	
X	DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 HUANG SHIANG ET AL: "Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells." Database accession no. PREV199497184772 XP002176825 * abrégé * & BLOOD, vol. 83, no. 6, 15 mars 1994 (1994-03-15), pages 1515-1526, ISSN: 0006-4971	1,3-6	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7) C12N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 5 septembre 2001	Examineur Sitch, W
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EP/3 FORM 1503 02-82 (PC4002)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 01 10 8584

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.7)
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1987 SMITH A G ET AL: "BUFFALO RAT LIVER CELLS PRODUCE A DIFFUSIBLE ACTIVITY WHICH INHIBITS THE DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONAL CARCINOMA AND EMBRYONIC STEM CELLS" Database accession no. PREV198784023147 XP002176826 * abrégé * & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 121, no. 1, 1987, pages 1-9, ISSN: 0012-1606</p> <p>---</p>		
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1993 SLAGER H G ET AL: "Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: Implications for the regulation of muscle formation and implantation." Database accession no. PREV199396074345 XP002176827 * abrégé * & DEVELOPMENTAL GENETICS, vol. 14, no. 3, 1993, pages 212-224, ISSN: 0192-253X</p> <p>---</p>		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.7)
A	<p>R. IAN FRESHNEY: "SECOND EDITION. CULTURE OF ANIMAL CELLS. A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE", ALAN R. LISS, INC., NEW YORK XP002176824 * page 187 - page 196 *</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
LA HAYE		5 septembre 2001	Sitch, W
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention F : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 (2-92) (Rev. 02/92)



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 01 10 8584

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.C1.7)
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 YANG Z ET AL: "Use of Avian Cytokines in Mammalian Embryonic Stem Cell Culture." Database accession no. PREV199497372027 XP002176828 * abrégé * & POULTRY SCIENCE, vol. 73, no. 7, 1994, pages 965-974, ISSN: 0032-5791</p>		
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1994 KAWASE EIHACHIRO ET AL: "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture." Database accession no. PREV199497136915 XP002176829 * abrégé * & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 161, no. 1, 1994, pages 91-95, ISSN: 0012-1606</p>		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C1.7)
P, X	<p>US 5 453 357 A (HOGAN BRIGID L M) 26 septembre 1995 (1995-09-26) * colonne 2, ligne 8 - ligne 21 * * colonne 4, ligne 3 - colonne 5, ligne 10 *</p>	1,3,4,6, 7	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 5 septembre 2001	Examinateur Sitch, W
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : amère-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 03 92 (P04032)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 01 10 8584

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

05-09-2001

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9315185 A	05-08-1993	AU 678147 B	22-05-1997
		AU 3596993 A	01-09-1993
		AU 3597093 A	01-09-1993
		BR 9305795 A	18-02-1997
		EP 0625007 A	23-11-1994
		IL 104536 A	14-07-1999
		JP 7504320 T	18-05-1995
		MX 9300447 A	29-07-1994
		MX 9300448 A	29-07-1994
		WO 9314629 A	05-08-1993
		US 5784992 A	28-07-1998
		ZA 9300585 A	01-09-1993
		ZA 9300586 A	01-09-1993
WO 9323528 A	25-11-1993	US 5340740 A	23-08-1994
		AU 4375193 A	13-12-1993
		US 5656479 A	12-08-1997
		US 5830510 A	03-11-1998
WO 9001541 A	22-02-1990	AT 175994 T	15-02-1999
		AU 623922 B	28-05-1992
		AU 4059089 A	05-03-1990
		DE 68928914 D	04-03-1999
		DE 68928914 T	09-09-1999
		DK 17091 A	04-04-1991
		EP 0380646 A	08-08-1990
		HK 1003208 A	24-03-2000
		JP 2740320 B	15-04-1998
		JP 3503241 T	25-07-1991
		NO 910385 A	04-04-1991
		US 5166065 A	24-11-1992
WO 9403585 A	17-02-1994	AU 4552993 A	03-03-1994
US 5453357 A	26-09-1995	US 5690926 A	25-11-1997
		US 5670372 A	23-09-1997

EPO FORM P0469

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)